

YENİDOĞAN TAYLARDA HİPOGAMMAGLOBULİNEMİ'NİN SAPTANMASINDA GLUTARALDEHİT KOAGULASYON TESTİ'NİN KULLANIMI

Aslan KALINBACA*

M. Erman OR**

Use of the Glutaraldehyde Coagulation Test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal foals.

Summary: *This study was performed to determine the usefulness of the Glutaraldehyde Coagulation Test (GCT) for detection of hypogammaglobulinemia caused by the failure of colostral antibody transfer in neonatal foals. In foals sera that were uniquely obtained between postpartum hours 24 and 60, the GCT was applied besides, total protein, albumin, total globulin, alfa-beta- and gammaglobulin concentrations and albumin/globulin (A/G) ratio were also measured.*

The mean total protein, total globulin, betaglobulin and gammaglobulin concentrations of the sera were 5.457 0.170, 2.991 0.162 0.850 0.044 1.347 0.165 respectively in 25 foals with GCT positive (83.3%) and were 3.480 0.226, 1.508 0.153, 0.474 0.132 and 0.242 0.097 respectively in 5 foals with GCT negative (16.7%). These values in GCT positive sera were found higher ($P<0.001$, $P<0.01$) than those of the GCT negative. Contrarily the mean A/G ratio was lower ($P<0.01$) in GCT positive (0.857 0.078) than in GCT negative (1.346 0.125). Changes in albumin and alfa globulin values were not statistically important.

As a result, it was decided that GCT, as a semiquantitative screening test, can be used practically and reliably for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal foals.

Key Words: Hypogammaglobulinemia, Glutaraldehyde, foal serum.

Özet: *Bu çalışma, yenidoğan taylarda kolostral antikor transferindeki yetersizlikten kaynaklanan hipogammaglobulineminin saptanmasında Glutaraldehyt Kaogulasyon Testi'nin (GCT) yararlığını ortaya koymak amacıyla yapıldı. Doğum sonrası 24-60. saatler arasında bir kez elde edilen tay serumlarında GCT uygulandı ve ayrıca total protein, albumin, total globulin, alfa- beta- gammaglobulin konsantrasyonları ve albumin/globulin (A/G) oranı da ölçüldü.*

GCT sonucu pozitif olan 25 tayda (% 83.3) ortalama total protein, total globulin, betaglobulin ve gammaglobulin konsantrasyonları sırasıyla 5.457 0.170, 2.991 0.162, 0.850 0.044, 1.347 0.165 iken, GCT sonucu negatif olan 5 tayda (% 16.7) bu değerler sırasıyla ortalama 3.480 0.226, 1.508 0.153, 0.474 0.132 ve 0.242 0.097 oldu. GCT sonucu pozitif olan taylara ait değerlerin negatif olanlardan daha yüksek ($P<0.001$, $P<0.01$) olduğu saptandı. Bunun aksine, ortalama A/G oranı GCT sonucu pozitiflerde (0.857 0.078), negatiflerden (1.346 0.125) daha düşük ($P<0.01$) bulundu. Al-

* Araş. Gör. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı, Ankara.

** Araş. Gör. Dr. I.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı, İstanbul.

bumin ve alfa globulin değerlerindeki değişiklikler ise istatistiksel olarak önemli görülmedi.

Sonuç olarak, taylarda hipogammaglobulineminin saptanmasında semikan-titatif bir gösterim testi olan GCT'nin pratik ve güvenli bir şekilde kullanılabil-ceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hipogammaglobulinemi, Glutaraldehit, tay serumu.

Giriş

Tektırnaklılar histolojik olarak epithelio-chorialis plasenta yapısına sahip olduklarından gebe kısırlıklarda maternal antikorların fetal döneminde yavruya geçişi mümkün olmaz (21), bu nedenle taylar analarından hipogammaglobulinemik olarak doğarlar (4, 21). Taylar doğumdan itibaren kendi antikorlarını yeterli düzeyde sentezleyebildikleri 1-3 aylık zamana kadar (4) çevresel enfeksiyöz ajanlara karşı sadece kolostrumdan transfer ettikleri pasif antikorlar tarafından korunurlar (5, 12, 21). Kolostral antikorların transferi doğumdan sonraki ilk 6 saatte maksimum olmakta, sonraki saatlerde giderek azalarak ortalama 24 saatte sona ermektedir (9).

Yenidoğan taylarda kolostral antikorların transferindeki bozukluklar, yavrunun ilk 24 saat içinde yeterli miktar kolostrum alamaması, alınan kolostrumun yavrunun bağırsaklarındaki pnositotik hücrelerin erken kapanması nedeniyle yeterince emilememesi, erken doğum veya annenin erken laktasyona girmesi yada kolostrumun antikor yoğunluğunun düşük olması gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir (4, 6, 15, 21).

Yenidoğan kuzu ve buzağılarda olduğu gibi taylarda da doğumdan sonraki ilk haftalarda ölüm olaylarının en yaygın olarak enfeksiyonlardan meydana geldiği (14), hipogammaglobulinemi durumunun enfeksiyonlara predispozisyon sağlayan en önemli faktör olduğu (6, 12, 14) ve ilk 24 saat sonrasında yavruların gammaglobulin düzeylerinin bilinmesi, gerekli özenin gösterilmesi açısından oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (16, 21). Bunun yanı sıra Baldwin ve ark. (2) ise taylarda çeşitli enfeksiyöz hastalıkların ve ölüm olaylarının meydana gelmesinin hipogammaglobulinemiden daha çok bakım, besleme ve çevre şartlarına bağlı olduğunu savunmuşlardır.

Glutaraldehit, bifonksiyonel bir aldehit olup serumda gammaglobulinlerle çapraz reaksiyona girerek koagülasyon meydana getirmektedir (6, 16, 22). Glutaraldehitin %10'luk solüsyonunun bir saatlik sürede gammaglobulin düzeyi 0.4 g/dl den düşük serumlarda gözle görülebilir bir koagülasyon meydana getirmediği,

0.4-0.6 g/dl arasında gevşek jel oluşturduğu ve 0.8 g/dl'nin üzerindeki miktarlarda ise tam koagülasyon meydana getirdiği bildirilmiştir (4, 6, 16, 21).

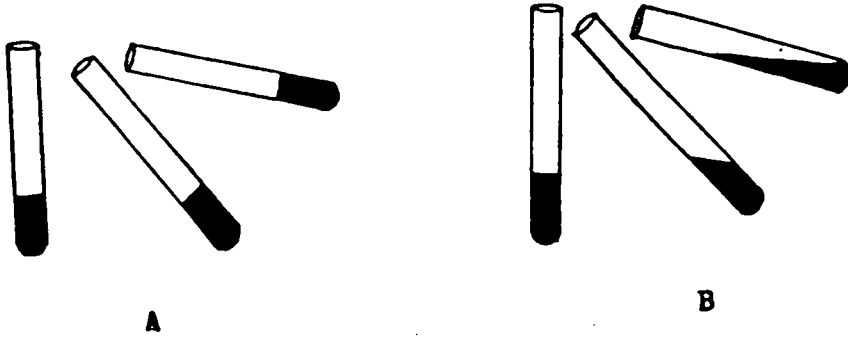
Serum protein elektroforezi serum proteinlerinin fraksiyonlarına ayrılmasında ve kantitatif ölçümlerinde kullanılan güvenilir bir metot olup, ayrıca birçok kimyasal metodun değerlendirilmesinde standart olarak kullanılmaktadır (10, 20). Bununla beraber gerek serum protein elektroforezi ve gerekse latex aglutinasyon, çinko sülfat presipitasyon, Single radial immunodiffüzyon ve ELISA gibi diğer metotlar (4, 6, 12, 15, 18) ya pahalı ve komplike araç gereçlere ihtiyaç göstermeleri ya da zaman alıcı uygulamalar gerektirmeleri nedeniyle saha şartlarında klinik kullanım için pratik bulunmamıştır (4, 6).

Bu çalışma yenidoğan taylarda kolostral antikor transferindeki yetersizliklerden kaynaklanan hipogammaglobulineminin tespit edilmesinde Glutaraldehit Koagülasyon Testinin (GCT) yararlılığını ortaya koymak amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı bünyesinde Şubat-Ağustos 1995 tarihleri arasında doğan toplam 30 tay oluşturdu. Taylardan doğam sonrası 24-60. saatler arasında bir kez kan alınıp serum elde edildi (6). Bir kısım serum GCT için ayrılıp geri kalanı -20 C'de dondurularak saklandı.

GCT nin yapılışı: Bir cam tüp içine konan 0.5 ml serum üzerine 50 µl, % 10'luk Glutaraldehit solüsyonu (%25'lik solüsyon Merck. Bu stok solüsyondan 2 kısım alınıp üzerine 3 kısım distile su eklenerek elde edildi.) ilave edilerek karıştırıldı. Tüp arasına sallanarak karışımın koagülasyon durumu kontrol edildi. Bir saatlik süre içinde akışkanlığını kaybeden, tüp sallandığında hatta ters çevrildiğinde hareket etmeyen örnekler pozitif, bu süre içinde akışkanlığını koruyan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi (4, 22). (Şekil 1).



Şekil 1: Pozitif (A) ve negatif (B) GCT sonuçları
Figure 1: Positif (A) and negatif (B) GCT results.

Serum analizleri: Dondurularak saklanan serumlar daha sonra çözdürülerek total protein (8) ve elektroforez ile protein ayrımı (albumin, alfa-, beta- ve gammaglobulin) (1) gerçekleştirildi. Total protein ve albumin değerlerinden yararlanılarak total globulin miktarı ile A/G oranları hesaplandı.

Doğumu takip eden 3 aylık dönemde bütün taylar düzenli bir şekilde klinik olarak kontrolden geçirildi. Ayrıca çalışmada ölen bir tayın da otopsis yapıldı.

Elde edilen değerlerin istatistiksel analizleri "t testi" metodu kullanılarak yapıldı (7).

Bulgular

Taylardan doğum sonrası 24-60. saatler arasında elde edilen kan serumlarında gerçekleştirilen GCT sonuçları toplu olarak tablo 1 de gösterildi.

Tablo 1'de görüldüğü gibi çalışmadaki 30 taya ait serumlardan 5'i (%16.7) negatif, 25'i (%83.3) ise pozitif reaksiyon verdi. Bütün taylara ait serumlardan 17'si (%56.7) ilk 10 dakikada pozitif sonuç verirken 2'si (%6.7) 10-20 dakikada, 4'ü (%13.3) 20-30 dakikada, 1'i (%3.3) 30-40 dakikada ve yine bir tanesi (%3.3) 50-60 dakikada pozitif sonuç verdi.

GCT negatif ve pozitif taylara ait serum protein değerleri ve istatistiksel değerlendirmeleri tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2'den de anlaşılacağı gibi pozitif GCT'li taylarda total protein (5.457 0.170), total globulin (2.991 0.162) betaglobulin (0.850 0.044) ve gammaglobulin (1.347 0.165) değerlerinin negatif GCT'li taylarınkine (sırasıyla 0.340 0.226, 1.508 0.153, 0.474 0.132 ve 0.242 0.097) göre önemli düzeyde ($P<0.001$, $P<0.01$) yüksek, A/G oranının (GCT pozitiflerde 0.857 0.078, GCT negatiflerde 1.346 0.125) ise düşük ($P<0.01$) olduğu görüldü. Albumin ve alfaboglobulin değerlerindeki artışlar ise istatistiksel olarak önemli olmadı.

Negatif GCT gösteren 5 taydan biri annesinin memelerindeki bozukluk nedeniyle doğduktan sonra hiç kolostrum alamadı. Bu nedenle 24-60. saatler arasında alınan kan serumunda gammaglobulin miktarı 0.03 g/dl olarak ölçüldü. Diğer atlardan sağılan sütlerle beslendi ancak akranlarına göre az gelişti. Devamlı olarak öksürük şikayeti gösteren ve doğumdan 58 gün sonra ölen bu tayın otopsisinde akciğerlerde makroskopik olarak çok sayıda apse odağının bulunduğu tespit edildi. Hipogammaglobulinemi gösteren diğer bir tay doğumdan hemen sonra ayağa kalkmış ve sağlıklı bir görünüm sergilemiş olmasına rağmen ilk 3 saatte annesini kendi isteği ile emmedi. Sık sık yardımla emzirmeye çalışıldı. Bu ve kalan 3 tay diğer taylarla birlikte düzenli bir gelişme gösterdiler

Tablo 1: Taylardan elde edilen kan serumu GCT sonuçları
Table 1: Blood serum GCT results obtained from foals.

Negatif sonuçlar	Pozitif						Toplam
	Sonuçlar						
>1 saat	0-10 dak.	10-20 dak.	20-30 dak.	30-40 dak.	40-50 dak.	50-60 dak.	
5 adet	17 adet	2 adet	4 adet	1 adet	-	1 adet	30 adet
%16.7	%56.7	%6.7	%13.3	%3.3	-	%3.3	%100

Tablo 2: Tay serumlarından elde edilen analiz sonuçları.
Table 2: Analysis results obtained from foals sera.

		GCT Negatif n=5	GCT Pozitif n=5
Total Protein (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	3.480 0.226 (2.70-4.00)	5.457*** 0.170 (4.30-7.00)
Albumin (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	1.972 0.108 (1.58-2.21)	2.473 ^{I.F.Y} 0.113 (1.67-4.18)
Total Globulin (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	1.508 0.153 (1.12-1.86)	2.991** 0.162 (1.92-4.52)
Albumin/Globulin	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	1.346 0.125 (1.04-1.79)	0.857** 0.078 (0.46-2.17)
Alfaglobulin (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	0.792 0.076 (0.60-1.06)	0.840 ^{I.F.Y} 0.066 (0.13-1.84)
Betaglobulin (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	0.474 0.132 (0.06-0.72)	0.850** 0.044 (0.36-1.36)
Gammaglobulin (g/dl)	\bar{x} $S\bar{x}$ Min-Maks.	0.242 0.097 (0.03-0.54)	1.347** 0.165 (0.17-3.05)

***:P<0.001 ** P<0.01 I.F.Y:İstatistiksel fark yok

Tartışma ve Sonuç

Kolostral antikor transferindeki yetersizliklere bağlı olarak gelişen hipogammaglobulineminin belirlenmesi amacıyla taylarda (4, 6, 12, 14), buzağılarda (3, 13, 22)) ve evcil olmayan bazı ruminantlarda (16, 21) birçok çalışmalar yapılmıştır. Taylarda yapılan çalışmalarda sürülerinde hipogammaglobulineminin meydana gelme oranını Perryman ve Mc Guire (18) %19.7, Mc Guire ve ark (12) %24.1, Pemberton ve ark (17) %10 ve Morris ve ark. (15) %2.9 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada 30 taydan 5'inde (16.7) hipogammaglobulinemi tespit edildi. Morris ve ark (15) bu oranların oluşmasında tayların doğum sırasında karşılaşılabileceği muhtemel güçlüklerle karşı azami dikkatin gösterilmesi ve doğum sonrasında kolostrumda meydana gelebilecek kayıpların önlenmesinin etkili olacağını bildirmiştir. Nitekim çalışmada hipogammaglobulinemi gelişen taylardan biri doğum sonrası 3. saate kadar annesini emememiş bu arada yapılan emzirme çabaları sırasında önemli miktarda kolostrum kaybı meydana gelmiştir.

Hipogammaglobulineminin enfeksiyonlara predispozisyon sağlayan en önemli faktörlerden biri olduğu bildirimlerine (6, 12, 14) benzer ola-

rak annesini hiç ememeyen bir tay (%20) şiddetli pnömoni ve yaygın akciğer apseleri sonucu öldü. Ancak kalan 4 tayın (%80) herhangi bir hastalık tablosu göstermeden normal olarak gelişmeleri Baldwin ve ark. (2) tarafından ileri sürülen taylarda öldürücü septisemi ve ölüm olaylarının meydana gelmesinde hipogammaglobulinemiden daha fazla çevre bakım ve besleme şartlarının etkili olduğu bildirimlerini destekler nitelikte olmuştur.

Taylarda kolostral antikor transferi bozukluklarının tespit edilmesinde GCT nin semikantitatif bir gösterici olduğu ve transfer olan IgG lerin %85-95 inin gammaglobulin fraksiyonuna dahil olduğu böylece gammaglobulin durumunun tespitinin direkt olarak IgG durumunu yansıtaacağı bildirilmiştir (11, 19, 20) Bu çalışmada iki grup arasında serum gammaglobulin oranlarında önemli farklılık (P<0.01) elde edilmesi bu bildirimle benzerlik göstermiştir.

İki grup arasında gammaglobulin miktarlarına ilaveten total protein, total globulin ve betaglobulin değerlerindeki önemli farklılık (P<0.001, p<0.01) GCT negatif taylarda kolostrum alımında veya metabolize edilmesindeki aksamalara işaret etmektedir. A/G oranındaki önemli fark (P<0.01) GCT pozitif tayların total

globulin miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelmiştir.

Serum gammaglobulin miktarı 0.4 g/dl den düşük olan taylarda antikor transferinin yetersiz olduğu ve bu serumların %10'luk Glutaraldehit solüsyonu ile koagule olmadığı, 0.8 g/dl nin üzerindeki miktarlarda ise koagulasyonun en geç bir saat içinde oluşacağı bildirimlerinin (3, 6, 16, 21) ışığında GCT negatif olan 5 tayın serum gammaglobulin ortalaması 0.242 0.097, pozitif sonuç veren 25 tayın ortalaması ise 1.347 0.165 olarak bulundu (Tablo 2).

Sonuç olarak, yenidoğan taylarda kolostral antikor transferi yetersizliklerinden kaynaklanan hipogammaglobulinemi durumunun tespit edilmesinde GCT'nin pratik olarak kullanılabilirlikte güvenilir bir metot olduğu kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. Anonim. (1970). *Clinical electrophoresis Gelman procedures for special electrophoresis*. pp. 1-20. Gelman Instrument Company, USA. Part No:75824-A.
2. Baldwin, J.L., Cooper, W.L., Vanderwall, D.K. and Erb, H.N. (1991). *Prevalence (treatment days) and severity of illness in hypogammaglobulinemic and normoglobulinemic foals*. JAVMA., 198 (3), 423-428.
3. Batmaz, H. (1992). *Sağlıklı ve septicemia neonatorumlu buzağılarda immunglobulin düzeylerinin saptanmasında glutaraldehide koagulasyon testi ve bazı testlerle karşılaştırılması*. U.Ü. Vet. Fak. Derg. 1 (11), 77-90.
4. Beetson, S.A., Hilbert, B.J. and Mills, J.N. (1985). *The use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinaemia in neonatal foals*. Aust. Vet. J. 62, 279-281.
5. Butler, J.E. (1973). *Synthesis and distribution of immunoglobulins*. JAVMA, 163 (7), 795-798.
6. Clabough, D.L., Conboy H.S. and Roberts, M.C. (1989). *Comparison of four screening techniques for the diagnosis of equine neonatal hypogammaglobulinemia*. JAVMA, 194 (12), 1717-1720.
7. Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. (1983). *İstatistik Metotları 1*. A.Ü. Zir. Fak. Yayınları 861. ders kitabı. Ankara.
8. Gradhowl, R.B.H. (1956). *Clinical laboratory method and diagnosis 1*. p. 300, 5. edition. The C.V. Mosby Company. St Louis.
9. Jeffcott, L.B. (1971). *Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal*. Vet. Rec. 88, 340-341.
10. Kaneko, J.J. (1980). *Clinical biochemistry of domestic animals*. p. 100.3. edition Academic press Inc. NewYork.
11. McGuire, T.C. and Crawford, T.B. (1973). *Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody*. Am. J. Vet. Res. 34, 1299-1303.
12. McGuire T.C., Crawford, T.B., Hollowell, A.L. and Macomber L.E. (1977). *Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals*. JAVMA, 170 (11), 1302-1304.
13. McGuire, T.C., Pfeiffer, NE., Weikel, J.M. and Bartsch, R.C. (1976). *Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease*. JAVMA, 169 (7), 713-718.
14. McGuire, T.C., Popple, M.J. and Banks, K.I. (1975). *Hypogammaglobulinemia predisposing to infection in foals*. JAVMA, 166 (1), 71-75.
15. Morris, D.D., Meirs, D.A. and Merryman, G.S. (1985). *Passive transfer failure in horses: Incidence and causative factors on a breeding farm*. Am. J. Vet. Res. 46 (11), 2294-2299.
16. O'Rourke, K.I. and Statterfield, W.C. (1981). *Glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal nondomestic ruminants*. JAVMA, 179 (11), 1144-1146.
17. Pemberton, D.H., Thomas, K.W. and Terry, M.J. (1980). *Hypogammaglobulinemia in foals: Prevalence on victorian study and simple methods for detection and correction in the field*. Aust. Vet. J. 56, 469-473.
18. Perryman, L.E. and McGuire, T.C. (1980). *Evaluation for immune system failures in horses and ponies*. JAVMA, 176, 1374-1377.
19. Rouse, B.T. (1971). *The immunoglobulins of adult equine and foal sera: A quantitative study*. Br. Vet. J. 127, 45-51.
20. Rumbaugh, G.E., Ardans, A.A., Ginno, D. and Trommershausen-Smith, A. (1979). *Identification and treatment of colostrum-deficient foals*. JAVMA, 174 (3) 273-276.
21. Satterfield, W.C. and O'Rourke K.I. (1981). *Management of hypogammaglobulinemic neonatal nondomestic hooded stock*. JAVMA. 179 (11), 1147-1149.
22. Tennant, B., Baldwin, B.H., Braun, R.K., Norcross, N.L. and Sandholm, M. (1979). *Use of the Glutaraldehyde Caugulation Test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves*. JAVMA, 174 (8), 848-853.